昆虫学报 Acta Entomologica Sinica, April 2011, 54(4): 381－389　　ISSN 0454-6296

草地螟普通气味结合蛋白Ⅰ(Lsti-GOBP1)蛋白表达纯化及结合特性分析

孙红岩[1,2]，尹　姣[2]，冯红林[1,2]，李克斌[2,*]，席景会[1,*]，曹雅忠[2]
(1. 吉林大学植物科学学院，长春 130062；2. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193)

摘要：气味结合蛋白在昆虫对寄主挥发性气味识别过程中有着重要的生理功能。本研究通过对草地螟 *Loxostege sticticalis* L. 普通气味结合蛋白Ⅰ(Lsti-GOBP1)进行克隆及原核表达的基础上，分离纯化得到体外重组的 Lsti-GOBP1 蛋白。并利用 N-苯基-1-萘胺(N-phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN)作为荧光探针研究了 Lsti-GOBP1 蛋白与醇类、醛类、酯、烯等 50 种气味标样的结合特性，结果表明 Lsti-GOBP1 可与其中 35 种气味化合物结合，但只有 1-己醇、1-庚醇、肉桂醛和莰烯 4 种气味标样能在 20 μmol/L 浓度(探针与蛋白结合的饱和浓度值)下将 1-NPN 从 Lsti-GOBP1 中替换 50%，其结合常数分别为 8.997, 7.283, 7.289 和 9.814 μmol/L。据此可以得出，Lsti-GOBP1 蛋白的气味物质结合谱很广，同时具有较强的特异性，其中 1-己醇、1-庚醇、肉桂醛、莰烯等化合物在草地螟识别寄主植物气味物质的过程中起重要作用。

关键词：草地螟；普通气味结合蛋白Ⅰ；蛋白表达；纯化；N-苯基-1-萘胺；荧光结合实验
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)04-0381-09

Expression, purification and binding characteristics of general odorant binding protein Ⅰ(GOBP1) from the meadow moth, *Loxostege sticticalia* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralididae)

SUN Hong-Yan[1,2], YIN Jiao[2], FENG Hong-Lin[1,2], LI Ke-Bin[2,*], XI Jing-Hui[1,*], CAO Ya-Zhong[2]
(1. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Odorant-binding proteins (OBPs) are responsible for physiological function via perception of volatile odors. Here we reported the successful expression and purification of a general odorant binding protein Lsti-GOBP1 from *Loxostege sticticalis* L. Lsti-GOBP1 was expressed using *Escherichia coli* Rosetta (DE3) prokaryotic expression system, and then purified using Histrap HP column, and the protein functions of Lsti-GOBP1 were tested by fluorescent probe N-phenyl-1-naphthylamine (1-NPN) binding assays and competitive binding assays with 50 kinds of chemical molecules. The results showed that Lsti-GOBP1 had the capability of binding 35 odorants. However, only 1-hexanol, 1-heptanol, cinnamaldehyde and camphene replaced 1-NPN from Lsti-GOBP1 by 50%, and their binding constants were 8.997, 7.283, 7.289 and 9.814 μmol/L, respectively. So, it can be speculated that Lsti-GOBP1 has a wide binding characteristics, but it has strong binding specificity to 1-hexanol, 1-heptanol, cinnamaldehyde and camphene, which probably all play a critical role in the process of recognizing different odorants in *L. sticticalis*.

Key words: *Loxostege sticticalis*; general odorant binding protein Ⅰ(GOBP1); protein expression; purification; N-phenyl-1-naphthylamine; fluorescent binding assay

昆虫气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)是由嗅觉感器内部支持细胞分泌的、浸润于感器淋巴液中并分布在感觉神经元轴突周围的一类水溶性酸性蛋白，越来越多的学者认为 OBPs 在感知和运输气味分子和信息素中具有一定的作用(Steinbrecht, 1998; Vogt *et al.*, 1999; Tegoni *et al.*,

基金项目：公益性行业(农业)科研专项(201003079)
作者简介：孙红岩，女，1984 年生，吉林松原人，硕士研究生，研究方向为昆虫分子生物学，E-mail: shykaoyan6@yahoo.cn
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: jhxi1965@jlu.edu.cn; kbli@ippcaas.cn
收稿日期 Received: 2010-09-16; 接受日期 Accepted: 2011-01-30

2000; Li *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010)。根据氨基酸序列的同源性和可识别气味分子的不同，科学家将鳞翅目昆虫气味结合蛋白(OBPs)分为性信息素结合蛋白(pheromone-binding protein, PBP)、普通气味结合蛋白(general odorant binding protein, GOBP)(包括 GOBP1 和 GOBP2 等)和触角结合蛋白类似物(ABPx)(Zhou *et al.*, 2009)。

昆虫第一个 OBP 是从多音大蚕蛾 *Antheraea polyphemus* 中发现的(Vogt and Riddiford, 1981)。目前为止，鳞翅目(Maida *et al.*, 2005; Xiu and Dong, 2007; 钟涛等, 2008; Gong *et al.*, 2009a, 2009b)、直翅目(Ban *et al.*, 2003b; Yu *et al.*, 2009)、等翅目(Ishida *et al.*, 2002)、双翅目(Ozaki *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011)、膜翅目(Calvello *et al.*, 2005)、半翅目(Qiao *et al.*, 2009)和鞘翅目(Graham *et al.*, 2003)等多种昆虫目中均发现 OBPs。随着 OBPs 被大量发现，关于 OBPs 与信息素及气味分子的结合特性研究也逐渐深入，荧光结合实验利用自身可发射荧光的高效特异探针与目的蛋白中的色氨酸相互作用，以此荧光强度为参照，通过荧光强度变化来完成气味分子与目的蛋白结合特性的分析，再根据结合常数的计算，可以直观地分析实验结果。目前常用的荧光探针主要有 4 种，包括 α-氨基蒽(1-aminoanthracene, 1-AMA)、N-苯基-1-萘胺(N-phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN)、8-苯胺基-1-萘磺酸(1-anilinonaphthalene-8-sulphonic acid, ANS)和 4, 4′-二苯胺基-1, 1′-联萘-5, 5′-二磺酸(4, 4′-dianilino-1, 1′- binaphthyl-5, 5′-sulfonate, bis-ANS)。荧光结合实验是目前最为常用的 OBPs 结合特性的分析方法。

草地螟 *Loxostege sticticalis* L. 是一种世界性分布的多食性农牧业害虫，可严重危害大豆、甜菜、苜蓿等 35 科 200 余种植物(张李香等, 2010)。尽管草地螟寄主植物种类广泛，但是其对不同寄主植物的产卵喜好性明显不同，嗅觉在其对不同植物的识别过程中起着极其重要的作用(尹姣等, 2004)。近年来关于草地螟对寄主植物选择性的研究中，已对草地螟喜好的几种寄主植物的主要挥发性化合物进行了测定(尹姣等, 2005)，同时也对草地螟成虫触角的气味结合蛋白 Lsti-GOBP1 (GenBank 登录号 EU413989)进行了初步研究(钟涛等, 2008)。本实验室也已经证明该蛋白基因主要在触角中表达，且在雌雄虫中表达量相差不大(另文发表)。本文通过草地螟气味结合蛋 Lsti-GOBP1 原核表达及蛋白结合特性的分析，系统研究了 Lsti-GOBP1 与多种气味化合物的结合特性，确定 Lsti-GOBP1 蛋白参与识别的气味种类与结合特征。

1 材料和方法

1.1 实验材料及主要试剂

质粒 DNA 为本实验室保存，克隆载体 pEASY-T1，感受态细胞 Trans1-T1，Rosetta(DE3)购自北京全式金生物技术有限公司；pET30-a(+)表达载体购自 Novagen 公司。常规 PCR 试剂，*Eco*R Ⅰ，*Not* Ⅰ，DNA 回收试剂盒，质粒提取试剂盒，T4 DNA 连接酶购自大连宝生物工程技术有限公司；肠激酶，BCA 蛋白质定量试剂盒，5 mL Ni-IDA-Sefinose™6 FF 预装柱与重组牛肠激酶(rbEK)购自上海生工生物工程技术服务有限公司-北京分公司；气味标样(表 1)，荧光探针 1-NPN 购自 Sigma 公司。

1.2 Lsti-GOBP1 原核表达载体的构建

引物设计：GOBP1SP：5′-*GAATTC*CAGGTGGAGGTGAAGGCAG-3′；GOBP1ASP：5′-*GCGGCC*GCCTAGTTCTCACCCTGCA-3′(斜体部分为酶切位点，分别为 *Eco*R Ⅰ，*Not* Ⅰ 酶切位点)。以本实验室储存的草地螟触角 Lsti-GOBP1 质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增，PCR 产物与 pET30-a(+)载体过夜连接，转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* Rosetta (DE3)中进行原核表达，酶切和 PCR 扩增鉴定。

1.3 Lsti-GOBP1 表达与纯化

根据黄培堂等(2002)，将鉴定成功的质粒 pET30 + Lsti-GOBP1 和作为对照的空载体均转化到大肠杆菌 Rosetta(DE3)感受态细胞中进行表达。蛋白表达中使用 500 mL LB，离心收集菌体，菌体重悬于 35 mL 结合缓冲液中，超声波破碎后离心，取上清用 0.45 μm 滤膜过滤(防止树脂被堵塞)，收集滤液蛋白。蛋白使用 Ni-NTA 柱进行纯化，用不同浓度咪唑洗脱缓冲液(20, 75, 100, 150, 250, 500 mmol/L)洗涤。蛋白在 Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液中过夜透析，超滤管(Millpore，截留分子量为 10 kD)进一步浓缩纯化蛋白，最后进行肠激酶酶切，获得较高纯度 Lsti-GOBP1。

1.4 Western 印迹检测

安装好转印装置，接好电源，将蛋白转印到 NC 膜上，用封闭液(TBST 溶解的 5% 脱脂奶粉)对膜进行封闭 2 h 处理，与兔抗 His 多克隆抗体室温

反应 2 h，用洗脱液 TBST 洗膜 4 次，加入羊抗兔二抗，室温反应 1 h，TBST 洗膜 4 次，加入含 NBT，BCIP 的显色液至条带清晰可见，自来水冲洗，放入 TBST 中终止显色反应。

1.5　重组 Lsti-GOBP1 的荧光测定和结合

室温条件下用 1 cm 的四通石英杯在荧光分光光度计进行实验，激发和发射缝宽均为 10 nm，灵敏度设为 2，配基 1-NPN 溶于甲醇中，至终浓度为 1 mmol/L，内源荧光检测和竞争结合实验在不同激发光下进行。

1.6　重组 Lsti-GOBP1 蛋白内源荧光特征的检测

取 2 mL 2 μmol/L 的重组 Lsti-GOBP1 蛋白(溶于20 mmol/L，pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液)放入石英杯中，在 270 nm 波长激发光下，记录 295～350 nm 波长范围内的荧光发射情况。然后，依次向石英杯中加入 1-NPN 至其终浓度为 4，8，12，16 μmol/L，记录 Lsti-GOBP1 蛋白与不同浓度 1-NPN 结合后的荧光发射情况。另外，在同样条件下记录 1-NPN 单独存在于 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液中时的荧光发射情况，作为对照。

1.7　竞争结合实验

将不同浓度的 1-NPN(1，2，4，6，8，10，12，14，16，18，20，22 μmol/L)分别加入到 2 mL 2 μmol/L Lsti-GOBP1 蛋白稀释液的反应杯中，在 337 nm 激发光下，记录在 380～450 nm 发射波长范围内，重组 Lsti-GOBP1 蛋白与不同 1-NPN 浓度结合后的荧光情况，并据此绘制饱和曲线。使用 Scatchard 方程计算 1-NPN 与重组 Lsti-GOBP1 蛋白的结合常数。

本实验中利用竞争性结合实验研究 50 种气味标样与重组 Lsti-GOBP1 蛋白的结合常数。实验中，将 2 μmol/L 重组 Lsti-GOBP1 蛋白与 4 μmol/L 1-NPN探针混合，逐步加入不同浓度的气味标样(用甲醇配制成浓度为 1 mmol/L 样品)，在 337 nm 激发光下，记录 380～450 nm 发射波长内的荧光变化情况（张帅等，2009）。

1.8　竞争结合实验数据分析

假设蛋白的活性为 100%，且在饱和状态时蛋白与亲和基的结合比例为 1∶1，然后以最大发射光谱处的荧光强度估计被结合的配基浓度。用 Scatchard 法线性化作图，横坐标为被结合配基的浓度，纵坐标为被结合配基的浓度与自由配基浓度的比值。根据[IC_{50}]值(竞争配基能替换 50% 的 1-NPN 时的浓度)计算竞争配体的解离浓度。

公式如下：$K_D = [IC_{50}]/(1 + [1\text{-NPN}]/K_{1\text{-NPN}})$，其中[1-NPN]为未结合 1-NPN 浓度；$K_{1\text{-NPN}}$ 为 GOBP1/1-NPN 复合物的解离浓度(Ban *et al.*, 2003a；金鑫，2003；Gong *et al.*, 2009b；张帅等，2009)

2　结果与分析

2.1　Lsti-GOBP1 基因原核表达载体的构建

将 Lsti-GOBP1 全长基因 *Eco*RⅠ和 *Not*Ⅰ双酶切，与经同样酶切处理的 pET30 载体连接。连接产物转化到 Trans-T1 感受态细胞中，从平板上随机挑取几个单菌落，在 LB 培养基中过夜培养，提取质粒，酶切鉴定(图 1)，测序结果表明成功构建了 Lsti-GOBP1 蛋白的原核表达载体。

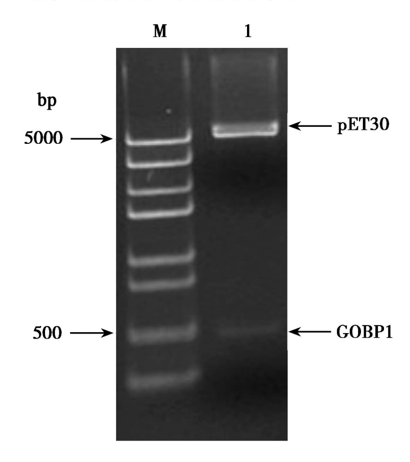


图 1　重组 Lsti-GOBP1 质粒酶切电泳分析

Fig. 1　Analysis of restriction digest of pET30/Lsti-GOBP1 on a 1.2% agarose gel

M：标准分子量 Trans DNA Marker Ⅲ；1：pET30/Lsti-GOBP1（*Eco*RⅠ，*Not*Ⅰ酶切）Restriction digest of pET30/Lsti-GOBP1 with *Eco*RⅠ and *Not*Ⅰ.

2.2　Lsti-GOBP1 蛋白表达与纯化

将重组 Lsti-GOBP1 蛋白质粒转化到大肠杆菌 Rosetta(DE3)中，经 IPTG 诱导表达，SDS-PAGE 分析结果显示在 26 kD 左右有一条特异条带，和预期的相一致。Western 免疫印迹检测也表明重组 Lsti-GOBP1 蛋白经诱导后，在相应位置产生特异条带(图2)，说明此特异条带为目的条带。在蛋白纯化过程中发现，用 75，100，150，250 mmol/L 4 个不同浓度咪唑洗脱缓冲液，洗脱的蛋白经重组牛肠激酶切下 His 标签后，可用于后续实验(图 3)。

2.3　重组 Lsti-GOBP1 蛋白荧光特征

荧光探针 1-NPN 单独存在时没有荧光产生，编码成熟 Lsti-GOBP1 蛋白的第 43 位氨基酸是色氨酸

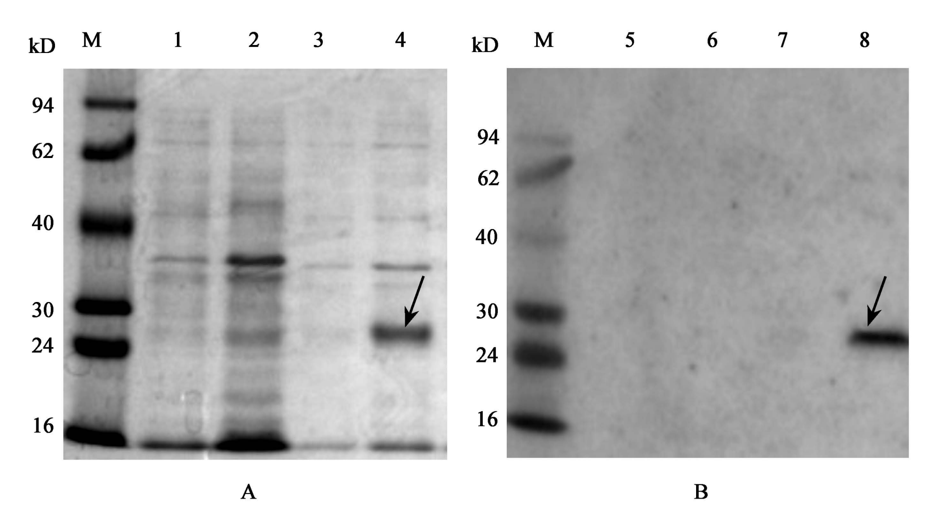


图 2 重组 Lsti-GOBP1 蛋白表达产物的 SDS-PAGE 分析(A)和 Western 印迹检测(B)

Fig. 2 SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) of expressed recombinant protein Lsti-GOBP1

M: 标准蛋白分子量 Protein molecular weight marker; 1, 5: 未经诱导的 pET30 菌体 Non-induced *Escherichia coli* pET30; 2: 诱导的 pET30 菌体 Induced *E. coli* pET30; 3, 6: 未诱导的重组 Lsti-GOBP1 蛋白菌体 Non-induced Lsti-GOBP1; 4, 7: 诱导的重组 Lsti-GOBP1 蛋白菌体 Induced Lsti-GOBP1; 5, 8: 重组 Lsti-GOBP1 蛋白的 Western 印迹 Western blot of Lsti-GOBP1. 箭头所指为目的蛋白 Lsti-GOBP1 is indicated by the arrow.

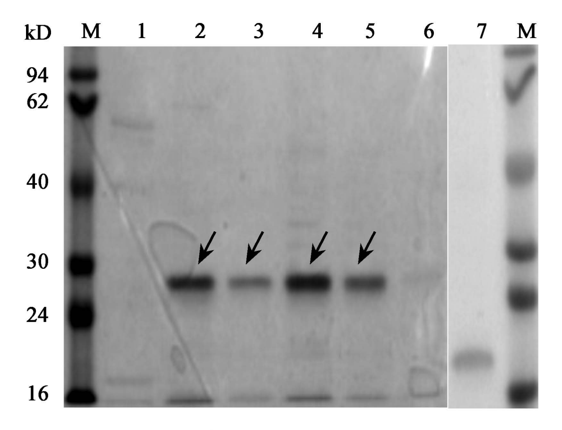


图 3 不同浓度咪唑洗脱缓冲液洗脱纯化和重组牛肠激酶(rbEK)酶切 Lsti-GOBP1

Fig. 3 Elution with different concentrations of imidazole buffer solution and rbEK in-cleaved purified protein Lsti-GOBP1

M: 标准蛋白分子量 Protein molecular weight marker; 1: 20 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱 Elution with 20 mmol/L imidazole buffer solution; 2: 75 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱 Elution with 75 mmol/L imidazole buffer solution; 3: 100 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱 Elution with 100 mmol/L imidazole buffer solution; 4: 150 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱 Elution with 150 mmol/L imidazole buffer solution; 5: 250 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱 Elution with 250 mmol/L imidazole buffer solution; 6: 500 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱 Elution with 500 mmol/L imidazole buffer solution; 7: 重组牛肠激酶切下 His 标签的纯化蛋白 Purified protein with His cleaved by rbEK. 箭头所指为目的蛋白 Lsti-GOBP1 is indicated by the arrow.

(Trp 43), 270 nm 激发光下在 335.1 nm 处产生最强内源荧光，加到 20 μmol/L 浓度荧光探针 1-NPN 后，内源荧光消失。337 nm 激发光下，蛋白单独存在时没有荧光，随着 1-NPN 探针浓度的增加，外源荧光强度逐渐增强，在 20 μmol/L 浓度时，荧光值趋于饱和，产生强于内源荧光量 8.1 倍的荧光量，所以选择外源荧光探针作为荧光报告因子。通过 Scatchard 方程计算出 Lsti-GOBP1 与 1-NPN 的结合常数为 2.842 μmol/L(图 4)，在气味标样竞争结合实验中，作为参与对照值荧光反应的 1-NPN 探针浓度应高于此常数，因此本实验选用 4 μmol/L。

2.4 配基竞争结合实验

由 2.3 可知，Lsti-GOBP1 与 1-NPN 结合的饱和浓度值约为 20 μmol/L，因此以此浓度来判断气味标样与 Lsti-GOBP1 的结合性强弱，用于竞争结合实验的 50 种气味标样中，35 种(表 1)与蛋白有结合反应，即在滴定到一定浓度时它们都能将 1-NPN 从 Lsti-GOBP1 中替换 50%(图 5)，但只有 1-己醇、1-庚醇、肉桂醛和莰烯 4 种气味标样能在 20 μmol/L 浓度下即可完成 50% 的替换，通过计算得出这 4 种化合物的结合常数分别为 8.997, 7.283, 7.289 和 9.814 μmol/L，其余化合物结合常数值相对较高。

3 讨论

普通气味结合蛋白在昆虫雌雄虫触角中均有表达，能很好地感知和识别外界气味分子变化，在昆虫定位寄主中起着重要作用(Vogt *et al*., 1999, 2002, Qiao *et al*., 2009; Zhou *et al*., 2009)。本文首次尝试对 Lsti-GOBP1 蛋白进行了表达纯化，并利用

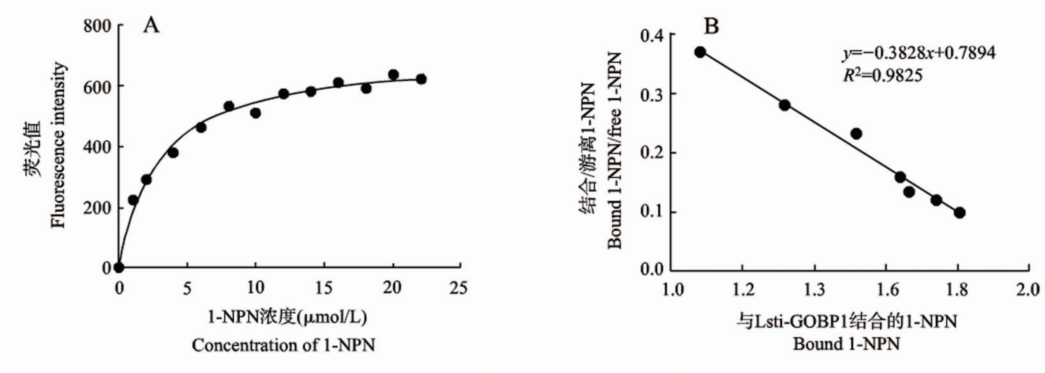


图 4　1-NPN 与 Lsti-GOBP1 的结合

Fig. 4　Binding of 1-NPN to Lsti-GOBP1

A：在 2 μmol/L Lsti-GOBP1 蛋白溶液中加入不同浓度 1-NPN 的荧光值 Fluorescence intensity of different concentrations of 1-NPN in Lsti-GOBP1；B：Lsti-GOBP1 蛋白与 1-NPN 结合的 Scatchard 方程 Scatchard plot of 1-NPN to Lsti-GOBP1.

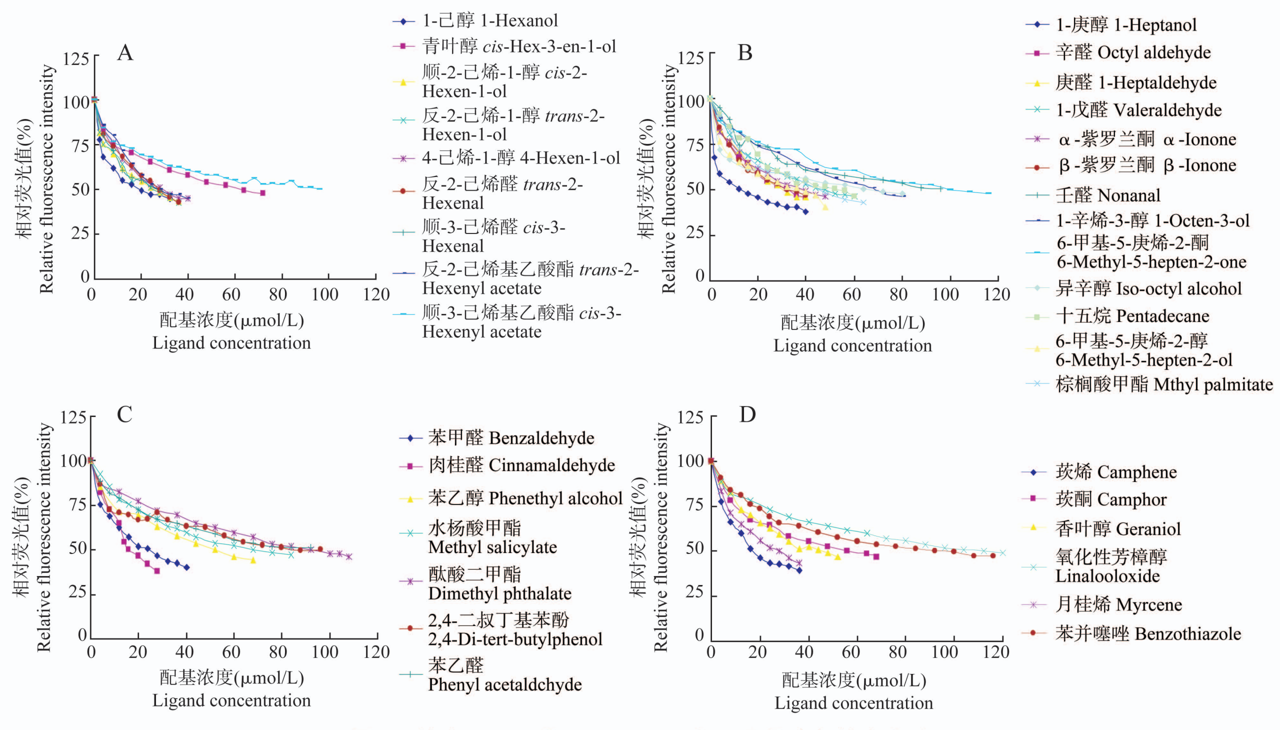


图 5　结合 1-NPN 的 Lsti-GOBP1 与配基的竞争结合实验

Fig. 5　Competitive binding of 1-NPN in Lsti-GOBP1 with ligands

A：绿叶气味 Green leaf volatiles；B：脂类化合物 Aliphatic compounds；C：芳香类化合物 Aromatic compounds；D：萜类和杂环类化合物的竞争结合实验 Terpenoids and heterocyclic compounds.

表 1　50 种配基化合物的结合特性

Table 1　Binding characteristics of 50 ligand compounds

配基化合物 Ligand compounds	纯度(%) Purity	解离常数(μmol/L) Dissociation constant
绿叶气味 Green leaf volatiles		
1-己醇 1-Hexanol	≥99.9	8.997
叶醇 *cis*-3-Hexen-1-ol	≥98	29.466
顺-2-己烯-1-醇 *cis*-2-Hexen-1-ol	95	14.552
反-2-己烯-1-醇 *trans*-2-Hexen-1-ol	96	14.579
4-己烯-1-醇 4-Hexen-1-ol	≥96	14.605
反-2-己烯醛 *trans*-2-Hexenal	98	12.844

续表 1 **Table 1 continued**

配基化合物 Ligand compounds	纯度(%) Purity	解离常数(μmol/L) Dissociation constant
顺-3-己烯醛 *cis*-3-Hexenal	50 Solution in triacetin	13.035
顺-3-己烯基乙酸酯 *cis*-3-Hexenyl acetate	≥98	43.956
反-2-己烯基乙酸酯 *trans*-2-Hexenyl acetate	≥98	14.579
脂类化合物 Aliphatic compounds		
1-庚醇 1-Heptanol	98	7.283
庚醛 1-Heptaldehyde	≥95	14.612
辛醛 Octyl aldehyde	99	16.401
1-戊醛 Valeraldehyde	97	21.828
壬醛 Nonanal	95	43.204
1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol	98	32.922
α-紫罗兰酮 α-Ionone	90	18.059
β-紫罗兰酮 β-Ionone	90	16.165
2-十三烷酮 2-Tridecanone	99	-
6-甲基-5-庚烯-2-酮 6-Methyl-5-hepten-2-one	99	45.393
6-甲基-5-庚烯-2-醇 6-Methyl-5-hepten-2-ol	≥99	19.324
异辛醇 Iso-octyl alcohol	99.7	32.862
正十一烷 n-Undecane	99	-
十四烷 Tetradecane	99.8	-
十五烷 Pentadecane	99.8	28.071
十六烷 Hexadecane	98	-
正十六烷 n-Hexadecane	99	-
十七烷 Heptadecane	98	-
棕榈酸甲酯 Methyl palmitate	97	23.645
芳香化合物 Aromatic compounds		
苯乙醇 Phenethyl alcohol	99	27.688
苯甲醛 Benzaldehyde	≥99.5	11.029
肉桂醛 Cinnamaldehyde	≥93	7.289
苯乙醛 Phenyl acetaldehyde	>94	48.561
2,4-二叔丁基苯酚 2,4-Di-tert-butylphenol	99	42.267
酞酸二甲酯 Dimethyl phthalate	99	41.460
水杨酸甲酯 Methyl salicylate	99	33.838
氨基酸甲酯 Methyl anthranilate	≥98	-
萜类化合物 Terpenoids		
柠檬烯(R)-(+)-limonene	97	-
α-水芹烯 α-Phellandrene	≥95	-
十八烯 Octadecene	90	-
月桂烯 Myrcene	≥95	14.678
莰烯 Camphene	95	9.814
莰酮 Camphor	96	29.051
α-蒎烯 α-pinene	99+	-
橙花叔醇 Nerolidol	98	-
β-石竹烯 β-Caryophyllene	≥98	-
氧化性芳樟醇 Linalooloxide	≥97	54.078
左旋芳樟醇 (-)-Linalool	≥98.5	-
香叶醇 Geraniol	98	21.808
α-松油醇 α-Terpineol	≥96	-
杂环化合物 Heterocyclic compound		
苯并噻唑 Benzothiazole	99	45.147

-：结合 Unbound.

荧光结合的方法对其结合特性进行了研究。由于气味结合蛋白本身存在色氨酸残基，270 nm 激发光下在 335.1 nm 处具有内源荧光，表明该残基位于蛋白疏水性的结合腔内(Sandler *et al*., 2000)。在 1-NPN 探针的作用下，蛋白内源荧光消失，外源荧光增强，可以判断 1-NPN 位于色氨酸附近，色氨酸将能量转移给 1-NPN(Zhou *et al*., 2009)，而荧光竞争结合实验过程中气味分子又替代探针与蛋白结合。

实验中所用的 50 种气味标样中，反-2-己烯醛、叶醇、顺-3-己烯乙酸酯、反-2-己烯乙酸酯、水杨酸甲酯、β-紫罗兰酮、十四烷、十六烷、十七烷、十八烯等 10 种化合物是灰菜和大豆等两种草地螟最适宜寄主植物的共有化合物(尹姣等，2005)，其中 6 种与 Lsti-GOBP1 蛋白有很好的结合性，而十四烷、十六烷、十七烷和十八烯则不与目的蛋白结合，推测这 4 种化合物可能与草地螟触角中其他气味结合蛋白作用，说明昆虫可能依靠多种气味结合蛋白与植物挥发性化合物的相互作用对寄主进行定位、产卵、危害等。本实验中与草地螟 Lsti-GOBP1 蛋白结合性强的气味化合物只有 1-己醇、1-庚醇、肉桂醛和莰烯 4 种气味化合物，其中 1-己醇为绿叶气味物质，1-庚醇为脂类化合物，肉桂醛为芳香类化合物，三类化合物被认为是植物固有的气味，在植食性昆虫嗅觉定位寄主中起重要作用(Du *et al*., 1998；张帅等，2009)。莰烯为萜类化合物，在吸引害虫天敌方面起作用(Musetti and Neal, 1997；Groot and MacDonald, 1999；娄永根和程家安，2000)。因此，推测这 4 种化合物在草地螟对寄主植物的定位过程中具有重要的指向作用。这 4 种物质都不是最适宜寄主植物的气味物质的主要成分(尹姣等，2005)，说明了 Lsti-GOBP1 对气味物质的结合特异性与气味物质的浓度没有直接的联系，表现了草地螟对寄主植物选择与趋避的独特性，也是在长期进化过程中的一种适应策略。

Lsti-GOBP1 蛋白结合的气味化合物中，醇类更易于结合 Lsti-GOBP1 蛋白，推测可能是由于羟基(-OH)在触角感受器淋巴液中的溶解度很高，便于被昆虫识别，但氧化性芳樟醇除外，亦或部分羟基被氧化而使草地螟触角淋巴液中的 pH 改变，蛋白构象发生变化，从而影响蛋白与配体的结合，致使结合能力减弱。醛类与蛋白具有较强结合能力的原因亦可能与醇类相似，酮类结合能力稍弱，而烯类、烷类与 Lsti-GOBP1 的结合能力很差，几乎不结合，据此推断羟基(-OH)、醛基(-C = OH)、羰基(-C = O)、双键(-C = C)、烷烃等官能团影响着气味分子与 Lsti-GOBP1 蛋白的有效结合(Leal, 2005；Gong *et al*., 2009b)。尽管曾有研究认为 C 原子个数与结合能力有关(Jiang *et al*., 2009)，但是本研究在实验中采用 C 原子个数在 5 ~ 17 之间不等的同类化合物进行研究，结果表明气味化合物的结合能力与碳原子个数没有明显的线性关系。即草地螟 Lsti-GOBP1 蛋白对具有某种官能团的化合物具有很好的结合能力，但与携带此官能团的化合物 C 原子个数无大关系。另外，通过本实验可以发现，同一种气味对于不同的气味结合蛋白可能具有相反的作用，如辛醛可与草地螟 Lsti-GOBP1 蛋白结合，但与中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 的 OBP2 不结合(张帅等，2009)。同时，不同气味对于同一种气味结合蛋白也表现出不同的功能，这应该是在长期进化过程中昆虫特有的嗅觉感受系统对其寄主植物组成的特异气味专一性的适应(Visser, 1983；Tingle and Michell, 1991；杜永均和严福顺，1994；严善春等，2003)。

参 考 文 献 (References)

Ban LP, Scaloni A, Brandazza A, Angeli S, Zhang L, Yan Y, Pelosi P, 2003a. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Molecular Biology*, 12: 125 – 134.

Ban LP, Scaloni A, D'Ambrosio C, Zhang L, Yan Y, Pelosi P, 2003b. Biochemical characterisation and bacterial expression of an odorant-binding protein from *Locusta migratoria*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60: 390 – 400.

Calvello M, Brandazza A, Navarrini A, Dani FR, Turillazzi S, Felicioli A, Pelosi P, 2005. Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 297 – 307.

Du YJ, Poppy GM, Powell W, Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM, 1998. Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attracts parasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology*, 24(8): 1355 – 1368.

Du YJ, Yan FS, 1994. The role of plant volatiles in tritrophic interactions among phytophagous insects, their host plants and natural enemies. *Acta Entomologica Sinica*, 37(2): 233 – 249. [杜永均，严福顺，1994. 植物挥发性次生物质在植食性昆虫、寄主植物和昆虫天敌关系中的作用机理. 昆虫学报，37(2)：233 – 249]

Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, Xia QY, Xiang ZH, 2009a. The odorant binding protein gene family from the genome of silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 10: 332.

Gong ZJ, Zhou WW, Yu HZ, Mao CG, Zhang CX, Cheng JA, Zhu ZR, 2009b. Cloning, expression and functional analysis of a general odorant-binding protein 2 gene of the rice striped stem borer, *Chilo*

suppressalis (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *Insect Molecular Biology*, 18: 405 – 417.

Graham LA, Brewer D, Lajoie G, Davies PL, 2003. Characterization of a subfamily of beetle odorant-binding proteins found in hemolymph. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2: 541 – 549.

Groot PD, MacDonald LM, 1999. Green leaf volatiles inhibit response of red pine cone beetle *Conophthorus resinosae* (Coleoptera: Scolytidae) to a sex pheromone. *Naturwissenschaften*, 86: 81 – 85.

Ishida Y, Chiang VP, Haverty MI, Leal WS, 2002. Odorant-binding protein from a primitive termite. *Journal of Chemical Ecology*, 28 (9): 1887 – 1893.

Jiang QY, Wang WX, Zhang ZD, Zhang L, 2009. Binding specificity of locust odorant binding protein and its key binding site for initial recognition of alcohols. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 440 – 447.

Jin X, 2003. Studies on Immunocytochemical Localization and Binding Properties of Odorant Binding Proteins in *Lousta migratoria manilensis* Antennae. MSc Thesis, China Agricultural University, Beijing. [金鑫, 2003. 飞蝗触角中气味分子结合蛋白的定位与结合特性. 北京: 中国农业大学硕士学位论文]

Joeph S, David WR (translated by Huang PT *et al.*), 2002. Molecular Cloning – A Laboratory Manual. Science Press, Beijing. 1228 – 1231, 1252 – 1255. [Joeph S, David WR (黄培堂等 译), 2002. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社. 1228 – 1231, 1252 – 1255]

Leal WS, 2005. Pheromone reception. *Topics in Current Chemistry*, 240: 341 – 360.

Li S, Picimbon JF, Ji SD, Kan YC, Qiao CL, Zhou JJ, Pelosi P, 2008. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372: 464 – 468.

Liu Z, Vidal DM, Syed Z, Ishida Y, Leal WS, 2010. Pheromone binding to general odorant-binding proteins from the navel orangeworm. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 787 – 794.

Lou YG, Cheng JA, 2000. Herbivore-induced plant volatiles: primary characteristics, ecological functions and its release mechanism. *Acta Ecologica Sinica*, 20(6): 1097 – 1106. [娄永根, 程家安, 2000. 虫害诱导的植物挥发物: 基本特性、生态学功能及释放机制. 生态学报, 20(6): 1097 – 1106]

Maida R, Mameli M, Müller B, Krieger J, Steinbrecht RA, 2005. The expression pattern of four odorant-binding proteins in male and female silk moths, *Bombyx mori*. *Journal of Neurocytology*, 34: 149 – 163.

Musetti L, Neal JJ, 1997. Toxicological effects of *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* and behavioral response of *Macrosiphum euphorbiae*. *Journal of Chemical Ecology*, 23(5): 1321 – 1332.

Ozaki M, Wada-Katsumata A, Fujikawa K, Iwasaki M, Yokohari F, Satoji Y, Nisimura T, Yamaoka R, 2005. Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science*, 309 (5732): 311 – 314.

Qiao HL, Tuccori E, He XL, Gazzano A, Field L, Zhou JJ, Pelosi P, 2009. Discrimination of alarm pheromone (*E*)-β-farnesene by aphid odorant-binding proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 414 – 419.

Sandler BH, Nikonova L, Leal WS, Clardy J, 2000. Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone binding protein bombykol complex. *Chemistry and Biology*, 7: 143 – 151.

Steinbrecht RA, 1998. Odorant-binding proteins: expression and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855: 323 – 332.

Tegoni M, Pelosi P, Vincent F, Spinelli S, Campanacci V, Grolli S, Ramoni R, Cambillau C, 2000. Mammalian odorant binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1482(1 – 2): 229 – 240.

Tingle FC, Michell ER, 1991. Effect of oviposition deterrents from elderberry on behavioral responses by *Heliothis virescens* to host-plant volatiles in flight tunnel. *Journal of Chemical Ecology*, 17 (8): 1621 – 1631.

Visser JH, 1983. Differential sensory perceptions of plant compounds by insects. In: Hedin PA ed. Plant Resistance to Insects. American Chemical Society Symposium Series Online, Washington DC. 208: 215 – 330.

Vogt RG, Callahan FE, Rogers ME, Dickens JC, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chemical Senses*, 24(5): 481 – 495.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161 – 163.

Vogt RG, Rogers ME, Franco MD, Sun M, 2002. A comparative study of odorant binding protein genes: differential expression of the PBP1-GOBP2 gene cluster in *Manduca sexta* (Lepidoptera) and the organization of OBP genes in *Drosophila melanogaster* (Diptera). *Journal of Experimental Biology*, 205: 719 – 744.

Xiu WM, Dong SL, 2007. Molecular characterization of two pheromone binding proteins and quantitative analysis of their expression in the beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 947 – 961.

Yan SC, Zhang DD, Chi DF, 2003. Advances of studies on the effects of plant volatiles on insect behavior. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 14(2): 310 – 313. [严善春, 张丹丹, 迟德富, 2003. 植物挥发性物质对昆虫作用的研究进展. 应用生态学报, 14 (2): 310 – 313]

Yang G, Winberg G, Ren H, Zhang SG, 2011. Expression, purification and functional analysis of an odorant binding protein AaegOBP22 from *Aedes aegypti*. *Protein Expression and Purification*, 75: 165 – 171.

Yin J, Cao YZ, Luo LZ, Hu Y, 2004. Effects of host plants on population increase of meadow moth, *Loxostege sticticalis* L. *Acta Phytophylacica Sinica*, 31(2): 173 – 178. [尹姣, 曹雅忠, 罗礼智, 胡毅, 2004. 寄主植物对草地螟种群增长的影响. 植物保护学报, 31(2): 173 – 178]

Yin J, Cao YZ, Luo LZ, Hu Y, 2005. Oviposition preference of the meadow moth, *Loxostege sticticalis* L., on different host plants and its chemical mechanism. *Acta Ecologica Sinica*, 25(8): 1844 – 1852. [尹姣, 曹雅忠, 罗礼智, 胡毅, 2005. 草地螟对寄主植物的选择性及其化学生态机制. 生态学报, 25(8): 1844 – 1852]

Yu F, Zhang SG, Zhang L, Pelosi P, 2009. Intriguing similarities between two novel odorant-binding proteins of locusts. *Biochemical*

and Biophysical Research Communications, 385: 369 – 374.

Zhang LX, Fan JS, Wang GQ, 2010. Research advances on *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Pyralidae) in China. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 26(1): 215 – 218. [张李香, 范锦胜, 王贵强, 2010. 中国国内草地螟研究进展. 中国农学通报, 26(1): 215 – 218]

Zhang S, Zhang YJ, Su HH, Gao XW, Guo YY, 2009. Binding characterization of chemosensory protein MmedCSP1 in *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(8): 838 – 844. [张帅, 张永军, 苏宏华, 高希武, 郭予元, 2009. 中红侧沟茧蜂化学感受蛋白 MmedCSP1 的结合特征. 昆虫学报, 52(8): 838 – 844]

Zhong T, Yin J, Liu H, Wang JJ, Li KB, Wei YG, Cao YZ, 2008. Cloning and sequence analysis of one general odorant binding protein gene from the meadow moth, *Loxostege sticticalis* (Linnaeus). *Plant Protection*, 34(4): 31 – 36. [钟涛, 尹姣, 刘怀, 王进军, 李克斌, 韦永贵, 曹雅忠, 2008. 草地螟触角普通气味结合蛋白基因的克隆及序列分析. 植物保护, 34(4): 31 – 36]

Zhou JJ, Robertson G, He XL, Dufour S, Hooper AM, Pickett JA, Keep NH, Field LM, 2009. Characterisation of *Bombyx mori* odorant-binding proteins reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. *Journal of Molecular Biology*, 389: 529 – 545.

(责任编辑：赵利辉)